

マウス子宮におけるインターロイキン-18遺伝子の発現

村上要介・楠本憲司・大月真理子・竹内 栄・高橋純夫

岡山大学大学院自然科学研究科高次生物科学講座・生体統御学分野

はじめに

インターロイキン-18(IL-18)は、インターフェロン- γ を誘導する因子として発見されたサイトカインである(1)。IL-18は、proIL-18(24 kDa)として産生された後に、caspase-1 (IL-1 β -converting enzyme, ICE)により切断されて成熟型のIL-18(18 kDa)になる。IL-18は生殖器官系や内分泌系の細胞にも発現が認められる(2-4)。IL-18の免疫系における作用は広範な解析がなされ、細菌感染刺激に対してはTh1細胞の増殖と分化を刺激し、また抗腫瘍作用を担うと考えられている(5、6)。我々はマウス子宮におけるIL-18 mRNAの発現を明らかにしたが、子宮におけるIL-18作用は不明である。そこで、本研究においては、マウス子宮におけるIL-18 mRNAおよびIL-18 受容体 α サブユニット(IL-18R α) mRNAの発現をRNase protection assay (RPA) 及び Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法により解析し、ついでIL-18遺伝子発現に及ぼす性ステロイドホルモンの効果を解析した。さらに、マウス子宮内膜上皮細胞および間質細胞の初代培養系を用いて、IL-18作用について解析した。

材料と方法

実験動物

ICR系マウスを使用した。2月齢の雌マウスを麻酔下で卵巣摘出し、2週間後に estradiol-17 β (E2, 250 ng) と progesterone (P4, 1 mg) を投与し、12時間後と48時間後に子宮を採取した。

RPAによるIL-18mRNA発現の解析

組織及び子宮内膜培養細胞からguanidinium isothiocyanateを用いる1段階法によりRNAを抽出した。IL-18 と GAPDH の RNA プローブは、Kusumoto *et al.* (2005) の方法に従って作製した(7)。RNAプローブとRNA試料を45℃で16時間反応させ、RNase A と RNase T1 で処理した。その後、電気泳動しオートラジオグラフィーをおこなった。IL-18 mRNAバンドの濃度を測定しglyceraldehydephosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA量により補正した。

RT-PCRによるIL-18mRNA及びIL-18R α mRNA発現の解析

抽出したRNAをオリゴdTプライマーを用いて SuperScript III First-strand Synthesis System (Invitrogen) により逆転写した。得られた cDNA を以下のプライマーセットをもちいて、TaKaRa Taq DNA polymerase (Takara Bio, 大津) により増幅した。IL-18, 5'-ACT GTA CAA CCG CAG TAA TAC GG-3', 5'-AGT GAA CAT TAC AGA TTT ATC CC-3' (436 bp); IL-18R α , 5'-CCA ACG AAG AAG CCA TAG ACA-3', 5'-TCA GGA TGA CAC TCT TTC AG-3' (261 bp); ICE, 5'-CAC GTC TTG CCC TCA TTA TC-3', 5'-CAC TCC TTG TTT CTC TCC AC-3' (394 bp) GAPDH, 5'-CTG GAA AGC TGT GGC GTG ATG-3', 5'-TGG AAG AGT GGG AGT TGC TGT T-3' (308 bp)。DNA変性は95℃、DNAの合成は、IL-18と GAPDHが60℃、IL-18R α とICEが65℃で、IL-18とIL-18R α が29サイクル、ICEとGAPDHが22サイクルの条件でPCRを行った。

子宮内膜上皮細胞と間質細胞の培養

3週齢雌マウス子宮から子宮内膜上皮細胞と間質細胞を単離し、無血清培養した(8、9)。培養液中にIL-18(MBL、名古屋)を投与し、24時間後のDNA合成を調べた。IL-18投与18時間後に、培養液中にbromodeoxyuridine (BrdU)を投与し、6時間後のBrdUの細胞への取込みをELISAキット(Roche Diagnostics, Mannheim)を用いて調べた。

統計処理

データは平均値と標準誤差であらわし、分散分析法で解析した。2群間の有意差の検定はt-testによった。

結果

マウス器官におけるIL-18及びIL-18R α mRNA発現の解析

IL-18 mRNA の発現をRPAにより調べた(図1A)。小脳、視床下部、下垂体前葉、下垂体中・後葉、肝臓、脾臓、副腎、精巣、卵巣及び子宮においてIL-18 mRNA が検出できた。IL-18R α

mRNAはRT-PCRにより解析したが、IL-18 mRNAの検出できた器官全てにおいて発現していた。

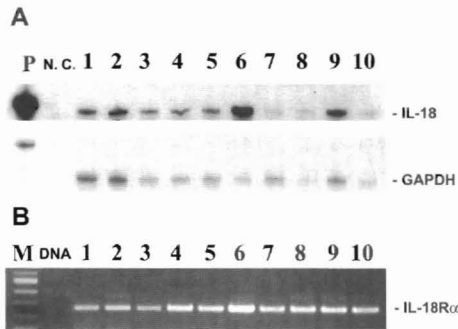


図1 マウスにおけるIL-18 mRNA (A) およびIL-18Rα mRNA (B) の発現。1, 小脳; 2, 視床下部; 3, 下垂体前葉; 4, 下垂体中・後葉; 5, 肝臓; 6, 脾臓; 7, 副腎; 8, 精巣; 9, 卵巣; 10, 子宮。P, プローブ; N.C.; イーストRNAを用いたコントロール; M, 分子量マーカー; DNA, ゲノムDNA。

発情周期に伴う子宮IL-18 mRNA発現の変化

2月齢雌マウスの発情周期を調べ、発情期と発情間期の個体の子宮IL-18 mRNAを調べた(図2)。発情間期の子宮では、IL-18 mRNA量が発情期に比べて有意に低下していた。

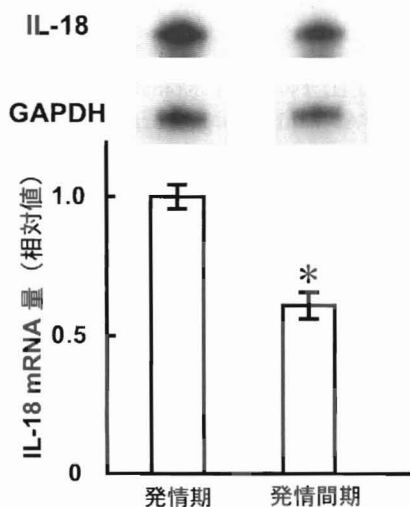


図2 発情期と発情間期における子宮IL-18 mRNA発現の変化。上段は、RPAの代表例。下段は、IL-18 mRNA量をGAPDH mRNA量で補正したデータ。各群7個体の平均値と標準誤差をあらわす。* $P < 0.001$ 、発情期と比較して有意の差。

卵巣摘出マウスにおける発情ホルモンと黄体ホルモンの子宮IL-18 mRNA発現に及ぼす効果

卵巣摘出マウスにE2 (250 ng) とP4 (1 mg) を投与し、IL-18 mRNAを半定量的RT-PCR法により調

べた(図3)。12時間では、E2群、P4群及びE2とP4同時投与群においてIL-18 mRNA量は有意に減少した。48時間では各群ともに対照群と有意差はなかった。

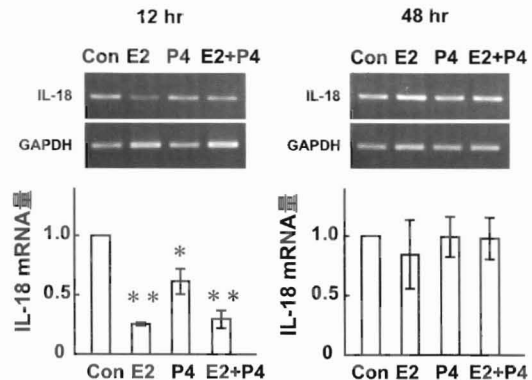


図3 卵巣摘出マウスにおけるE2 (250ng) とP4 (1mg) 投与によるIL-18 mRNA発現の変化。上段は、RT-PCR産物を電気泳動しethidium bromideで染色した代表例。下段は、IL-18 mRNA量をGAPDH mRNA量で補正したデータ。各群3試料の平均値と標準誤差をあらわす。* $P < 0.05$; ** $P < 0.001$ 、対照群 (Con) と比較して有意の差。

子宮内膜上皮細胞と間質細胞の培養系におけるIL-18, IL-18Rα及びICE mRNAの発現

マウス子宮内膜より上皮細胞と間質細胞を単離し、無血清培養した。IL-18, IL-18Rα及びICE mRNAの発現をRT-PCRにより解析したところ、

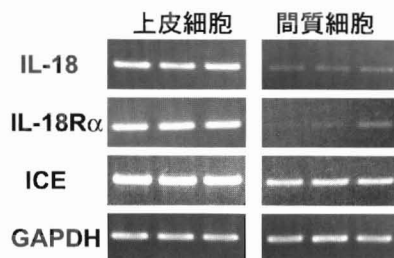


図4 マウス子宮内膜上皮細胞と間質細胞の初代培養細胞におけるIL-18, IL-18Rα, ICE mRNAの発現。細胞種ごとに独立した3培養皿から採取した試料の結果を示す。

両細胞ともに各mRNAが発現していた(図4)。

子宮内膜上皮細胞と間質細胞の培養系におけるIL-18のDNA合成に及ぼす効果

培養系を用いて子宮内膜上皮細胞と間質細胞のDNA合成に及ぼすIL-18の効果を調べた(図5)。IL-18投与24時間後では、両細胞ともにDNA合成に変化は認められなかった。

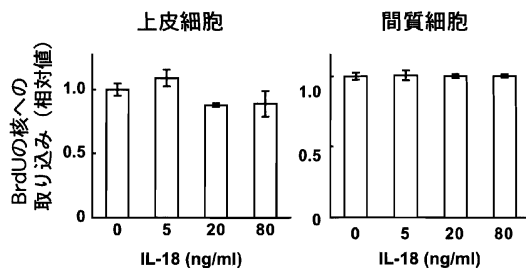


図5 マウス子宮内膜上皮細胞と間質細胞の初代培養細胞におけるIL-18投与によるDNA合成への効果。無血清培養している上皮細胞と間質細胞にIL-18を投与し、24時間後のDNA合成をBrdU取込みの測定により調べた。両細胞ともにIL-18によるDNA合成促進効果はなかった。

考察

本研究によりIL-18 mRNAとIL-18Rα mRNAはマウスの様々な器官に発現することから、IL-18が生体内で広範に作用することが示唆された。精巣、卵巣及び子宮において発現が認められ、IL-18は免疫作用のみならず生殖機能の制御に関与する可能性が考えられる。我々の *in situ* hybridizationによる解析では、IL-18 mRNAは、主に子宮内膜間質細胞と子宮腺上皮細胞で検出され、内腔上皮細胞での発現は少なかった(7)。本研究では、子宮内膜から単離した上皮細胞と間質細胞に、IL-18, IL-18Rα及びICEの各mRNAが発現していたことから、子宮内膜上皮細胞と間質細胞において、前駆体IL-18が産生され、ついでICEにより成熟型IL-18に変換されることが推察される。両細胞にIL-18Rα mRNAが発現していることから、IL-18は自己分泌的または傍分泌的に子宮内膜細胞に作用していることが推察される。E2及びP4によりIL-18 mRNAは減少していたので、性ステロイドホルモンが子宮においてはIL-18遺伝子の転写を抑制することが示唆される。

マウスにおいて子宮IL-18 mRNAは発情周期に応じて変動していた。ヒト子宮においても軽微ではあるが排卵周期に応じてIL-18の発現は変動し、増殖期中期には発現は低く、分泌期の後期には増加する(10)。IL-18 mRNA発現は性ステロイドホルモンによって抑制されているので、発情周期に伴う子宮IL-18 mRNAの変動は、性ステロイドホルモン濃度の変動に起因すると考えられる。本研究ではIL-18タンパク質の発現は未解析であるが、IL-18 mRNA発現が低下していることからIL-18作用の低下が推察される。したがって、マウスにおいてIL-18は発情周期に関連する子宮機能の制御に関与すると推察される。

E2とP4は、子宮内膜細胞のIL-18 mRNA発現を

抑制したが、その一方インスリン様成長因子 I (IGF-I) の発現を高めた(11)、子宮内膜の増殖を促進する(9)。培養細胞を用いた解析から、IL-18は子宮内膜細胞の増殖には関与しないことが示された。IL-18は、Fas発現を高めた(12)、Fas-L, Bcl-XS, IL-1βやTNF-αを介して血管内皮細胞にアポトーシスを誘導する(13、14)。このような知見から子宮内膜においてIL-18は、抗増殖作用またはアポトーシスの誘導に関与している可能性が考えられる。

要約

マウス小脳、視床下部、下垂体前葉、下垂体中・後葉、肝臓、脾臓、副腎、精巣、卵巣及び子宮においてIL-18 mRNAが発現することを明らかにした。子宮においてIL-18 mRNAは発情期に発現が高く、発情間期には減少していた。E2及びP4投与により子宮のIL-18 mRNA量は減少した。培養子宮内膜上皮細胞ならびに間質細胞においては、IL-18によるDNA合成促進効果は認められなかった。

謝辞

本研究は文部科学省科学研究費補助金(14654172)により行われた。

文献

- (1) Okamura H, Tsutsui H, Komatsu T, Yutsudo M, Hakura A, Tanimoto T, Torigoe K, Okura T, Nukada Y, Hattori K, et al. Cloning of a new cytokine that induces IFN- γ production by T cells. *Nature* 378: 88-91 (1995)
- (2) Conti B, Jahng JW, Tinti C, Son JH, Joh TH. Induction of interferon-(inducing factor in the adrenal cortex. *J Biol Chem* 272: 2035-2037 (1997)
- (3) Tsutsui H, Matsui K, Okamura H, Nakanishi K. Pathophysiological roles of interleukin-18 in inflammatory live diseases *Immunol Rev* 174: 192-209 (2000)
- (4) Tsuji Y, Tamaoki TH, Hasegawa A, Kashiwamura S, Iemoto A, Ueda H, Muranaka J, Adachi S, Furuyama J, Okamura H, Koyama K. Expression of interleukin-18 and its receptor in mouse ovary. *Am J Reprod Immunol* 46 : 349-357 (2001)
- (5) Ushio S, Namba M, Okura T, Hattori K, Nukada Y, Akita K, Tanabe F, Konishi K, Micallef M, Fujii M, Torigoe K, Tanimoto T, Fukuda S, Ikeda M, Okamura H, Kurimoto M. Cloning of the cDNA for human IFN- γ -inducing factor, expression in *Escherichia coli*, and studies on the biology-

- ic activities of the protein. *J Immunol* 156 : 4274-4279 (1996)
- (6) Osaki T, Peron JM, Cai Q, Okamura H, Robbins PD, Kurimoto M, Lotze MT, Tahara H. IFN- γ -inducing factor/IL-18 administration mediates IFN- γ - and IL-12-independent antitumor effects. *J Immunol* 160 : 1742-1749 (1998)
 - (7) Kusumoto K, Murakami Y, Otsuki M, Kanayama M, Takeuchi S, Takahashi S. Interleukin-18 (IL-18) mRNA expression and localization of IL-18 mRNA-expressing cells in the mouse uterus. *Zool Sci* (in press)
 - (8) Shiraga M, Takahashi S, Miyake T, Takeuchi S, Fukamachi H. Insulin-like growth factor-I stimulates proliferation of mouse uterine epithelial cells in primary culture. *Proc Soc Exp Biol Med* 215 : 412-417 (1997)
 - (9) Komatsu N, Maekawa T, Takeuchi S, Takahashi S. Epidermal growth factor and transforming growth factor- α stimulate the proliferation of mouse uterine stromal cells. *Zool Sci* 20 : 639-645 (2003)
 - (10) Yoshino O, Osuga Y, Hirota Y, Koga K, Hirata T, Yano T, Ayabe T, Tsutsumi O, Taketani Y. Endometrial stromal cells undergoing decidualization down-regulate their properties to produce proinflammatory cytokines in response to interleukin-1 β via reduced p38 mitogen-activated protein kinase phosphorylation. *J Clin Endocrinol Metab* 88 : 2236-2241 (2003)
 - (11) Kapur S, Tamada H, Dey SK, Andrews GK. Expression of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and its receptor in the peri-implantation mouse uterus, and cell-specific regulation of IGF-I gene expression by estradiol and progesterone. *Biol Reprod* 46 : 208-219 (1992)
 - (12) Menon R, Lombardi SJ, Fortunato SJ. IL-18, a product of choriodecidual cells, increases during premature rupture of membranes but fails to turn on the Fas-FasL-mediated apoptosis pathway. *J Assist Reprod Genet* 18 : 276-284 (2001)
 - (13) Dao T, Ohashi K, Kayano T, Kurimoto M, Okamura H. Interferon- γ -inducing factor, a novel cytokine, enhances Fas ligand-mediated cytotoxicity of murine T helper 1 cells. *Cell Immunol* 173 : 230-235 (1996)
 - (14) Chandrasekar B, Vemula K, Surabhi RM, Li-Weber M, Owen-Schaub LB, Jensen LE, Mummidi S. Activation of intrinsic and extrinsic proapoptotic signaling pathways in interleukin-18-mediated human cardiac endothelial cell death. *J Biol Chem* 279 : 20221-20233 (2004)